

Metabolism of tryptophan metabolites in human erythrocytes

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Tomoda, Akio, Mawatari, Kazuhiro メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24517/00034925

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



ヒト赤血球によるトリプトファン
代謝産物の病態代謝

(60570127)

昭和60年度科学研究費補助金（一般研究C）研究成果報告書

昭和62年 3 月

研究代表者 友 田 燦 夫

（金沢大学 医学部 生化学第1教室）

は し が き

本研究は文部省科学研究費補助金（一般研究C，課題番号 60570127）を昭和60年，61年度の2カ年に受け，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，3-ヒドロキシアントラニル酸などのヒト赤血球における代謝とそのメカニズムを解明するために行われた。

研究組織

研究代表者：友 田 燁 夫（金沢大学医学部生化学第一教室）

研究分担者：馬 渡 一 浩（金沢大学医療短期大学部衛生技術学科）

研究経費

昭和60年度 1,200 千円

昭和61年度 400 千円

計 1,600 千円

研 究 発 表

(1) 学会誌等

1. J. Yamaguchi , A. Tomoda and Y. Yoneyama
Reaction of intracellular hemoglobin of human erythrocytes with 3-hydroxykynurenine,
a metabolite of tryptophan ; proceedings of 13th international congress of biochemistry
(1985)
2. K. Tanishima , K. Tanimoto , A. Tomoda , K. Mawatari , S. Matsukawa , Y. Yoneyama ,
H. Ohkuwa and E. Takazakura
Hereditary methemoglobinemia due to cytochrome b₅ reductase deficiency in blood cells
without associated neurological and mental disorders ; Blood 66, 6 ; 1288-1296 (1985)
3. A. Tomoda , T. Hashimoto , K. Tanishima , F. Matsubara and Y. Yoneyama
Studies on the effect of thyroid hormones on human red cell acetylcholine esterase ;
Abstract of 9th international thyroid congress p198 (1985)
4. A. Tomoda , T. Hashimoto , K. Tanishima , F. Matsubara and Y. Yoneyama
Lack of effects of thyroid hormones on human erythrocyte acetylcholine esterase ;
Endocrinologica Japonica , 32 , 5 , 753--757 (1985)
5. A. Tomoda , J. Yamaguchi , H. Kojima , K. Amemiya and Y. Yoneyama
Mechanism of o-aminophenol metabolism in human erythrocytes ; FEBS Letters 196 ,
44 - 48 (1986)
6. A. Tomoda and Y. Yoneyama
Reaction of oxy- and methemoglobin with tryptophan metabolites , 3-hydroxyanthranilic acid
and 3-hydroxykynurenine ; Hemoglobin 10, 1, 33 - 38 (1986)
7. N. P. Laborde , N. Lachant , A. Tomoda , M. H. Chan and K. R. Tanaka
Effect of triethyltin on enzyme activity in human adult and cord red cells ; Enzyme 35 ,
87 - 95 (1986)
8. K. Yagawa , M. Nakanishi , S. Hayashi , M. Kaku , Y. Ichinose , T. Itoh , A. Tomoda ,
Y. Yoneyama and N. Shigematsu
Abolishment of inhibitory effects of 3'-deazaadenosine on superoxide generation of guinea
pig phagocytes by pre-exposure of phorbol myristate acetate ; FEBS Letters 201, 2,
287 - 290 (1986)

9. A. Tomoda, K. Yagawa and Y. Yoneyama
Accumulation of inosine 5'-monophosphate in human erythrocytes incubated with inosine
Biomed. biochim. acta (1987, in press)
10. K. Tanishima, A. Tomoda and Y. Yoneyama
Congenital methemoglobinemia and mental retardation; Blood 68, 3, p795 (1986)
11. A. Tomoda, J. Yamaguchi, M. Minami, and Y. Yoneyama
Metabolism of drugs in human erythrocytes (1987, in press)

(2) 口頭発表

1. 白沢栄一, 友田燁夫, 米山良昌
ヒト赤血球による3-ヒドロキシアントラニル酸の代謝について
第21回日本臨床代謝学会予稿集 (1985)
2. 友田燁夫, 山口順道, 米山良昌
オルトアミノフェノールによるヒト赤血球内ヘモグロビンの酸化反応とオルトアミノフェノールの代謝について 臨床代謝学会記録 (1987, 印刷中)
3. 友田燁夫, 米山良昌
HPLCによるヒト赤血球内IMPの変動の解析 日本臨床化学会記録 (1987, 印刷中)
4. 友田燁夫, 山口順道, 米山良昌
ヒト赤血球によるO-アミノフェノールの代謝反応について 生化学 57, p1218 (1985)
5. 山口道順, 友田燁夫, 米山良昌
ヒト赤血球における3-ヒドロキシキヌレニンの代謝 生化学 57, p1218 (1985)
6. 友田燁夫, 米山良昌
ヒト赤血球におけるイノシンモノリン酸 (IMP) の合成とその変動について 生化学 58, p778 (1986)

(3) 出版物

1. 友田燁夫, 米山良昌
メトヘモグロビンの生成と還元反応について 蛋白質・核酸・酵素 (1987 印刷中)
2. 友田燁夫
酵素資源源としての赤血球利用法の開発 Medical Bulletin (1987 印刷中)

研 究 成 果

はじめに

トリプトファン及びその代謝物質の代謝は生理的に重要である。この代謝系は肝臓や腎臓などほとんどの臓器の細胞に存在するがヒト赤血球でこのような代謝系が存在するかについては報告がなく十分に検討されていなかった。私達はトリプトファンの代謝中間体である3-ヒドロキシキヌレンin(3-HKN)及び3-ヒドロキシアントラニル酸(3-HAT)の代謝をヒト赤血球を用いてしらべたところ、他の臓器で知られているような代謝経路とは異った反応経路で反応が進行し、赤褐色の色素に変化することを見い出した。本研究ではこのようなヒト赤血球における3-HKN及び3-HAT,あるいはこれらの物質の構造類似物質であるオルトアミノフェノールの代謝のメカニズムについて詳しく検討した。

I. ヒト赤血球における 3-HKN の代謝反応について

〔要 旨〕

ヒト赤血球浮遊液に 3-HKN 溶液を加え 37°C, pH 7.0 においてインキュベートしたところ、赤血球内ヘモグロビンはメトヘモグロビンへ変化していった。このようなヘモグロビンの酸化反応と共役して 3-HKN は褐色の色素であるキサントマチンへ変化した。キサントマチンの同定は分光学的方法、高速液体クロマトグラフィ等で行った。また、このようなヒト赤血球における 3-HKN のキサントマチンへの代謝反応を種々の条件下でしらべたところ、酸素の存在が必須であり、一酸化炭素を加えることにより反応は著しく阻害された。

〔序〕

3-HKN は NAD (ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド) の前駆体として生理的に重要なトリプトファン代謝中間体である。この 3-HKN はトリプトファンがキヌレニナーゼの作用をうけて合成されるものであり、さらに代謝をうけると 3-HAT へ変化する。このような代謝経路については古くよりよく研究されており、生体内の種々の臓器の有核細胞で存在することが確認されている。

一方ヒト赤血球は他の細胞と異って核、ミトコンドリア、ミクロゾームなどの細胞内小器官を失っており、核酸の合成、タンパク質の合成、アミノ酸の代謝、脂肪酸の合成などはみられない。代謝系としては解糖系およびペントース回路が存在するのみである。また赤血球内のタンパク質としては 95% 以上がヘモグロビンで占められている。このような理由でヒト赤血球におけるトリプトファン代謝については全くといってよいほど検討されていなかった。私達はヒト赤血球に 3-HKN 溶液を添加したところ、赤血球内のヘモグロビンが酸化されてメトヘモグロビンへ変化していくことを発見した。このことはヘモグロビンの酸化とともに 3-HKN が還元をうけていることを示唆しており、赤血球内での還元された物質の生成が考えられる。そこで 3-HKN のヒト赤血球内における代謝物質について検討したところ赤褐色系色素であるキサントマチンであることが明らかになった。この章ではヒト赤血球におけるこのような 3-HKN の代謝及びキサントマチンの生成条件について検討した結果について述べる。

〔実験方法〕

ヒト赤血球は ACD 保存血より得た。0.9% NaCl 溶液で十分洗浄したのちリンゲル液に浮遊して実験に用いた (ヘマトクリット値, 15%)。3-HKN (和光純薬製) は 0.1 規定塩酸溶液にかしたのち 0.1 規定カセイソーダ溶液で中和してすぐ使用した。赤血球浮遊液に 3-HKN 溶液を

少しずつ加えた（最終濃度 2.7 mM）のち、この赤血球浮遊液を pH 7.0, 37°C にてインキュベートした。一定時間ごとに試料をとって凍結融解法で溶血したのち、セファデックス G-25 (fine) に通してヘモグロビン分画とオレンジ色の分画とを各々分取した。ヘモグロビンの分画は等電点電気泳動に使用し、オレンジ色の分画は 3-HKN の代謝産物の同定に用いた。なお、合成キサントマチンは 3-HKN にフェリシアンカリを加えて得た。

〔結果と考察〕

a. 3-HKN によるヒト赤血球内ヘモグロビンの酸化

3-HKN にヒト赤血球内ヘモグロビンの酸化作用があることについては報告がなかったが、私達はこのことを明らかにした (図 1)。図 1 はヒト赤血球に 3-HKN を加えて 37°C においてインキュベートしたさいにみら

れる赤血球内ヘモグロビンの変化を平板ゲル等電点泳動でしらべた結果を示す。その結果、赤血球内のオキシヘモグロビン (二価鉄) は時間とともに $(\alpha^3+\beta^{2+})_2$ や $(\alpha^{2+}\beta^{3+})_2$ のような半酸化型ヘモグロビンに酸化され、さらにメトヘモグロビン $(\alpha^3+\beta^{3+})_2$ へ酸化されていくことが明らかになった。また、他の酸化物質による酸化反応の場合とは異ってメトヘモグロビンが一定量できるとそれ以上増加はしなかった。このことは生成されたメトヘモグロビンが 3-HKN と反応して還元型ヘモグロビンへもどっていることを示唆している。この現象については第 III 章で詳しく述べ

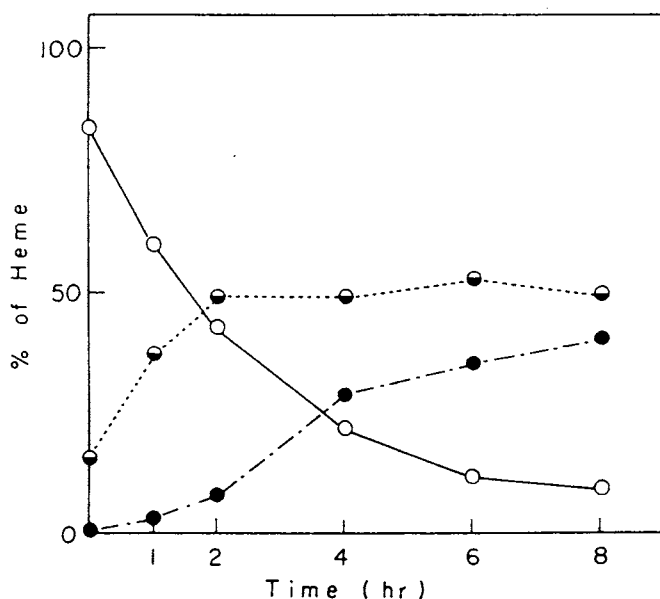


図 1 3-HKN によるヒト赤血球内ヘモグロビンの酸化反応

ヒト赤血球に 3-HKN を加えたのち一定時間ごとに試料を採取した。この試料を溶血したのち、セファデックス G-25 カラムに通してヘモグロビン溶液を得た。このヘモグロビン溶液について平板ゲル等電点電気泳動を行いヘモグロビンの分析を行った。(○); オキシヘモグロビン, (◐); $(\alpha^{2+}\beta^{3+})_2 + (\alpha^3\beta^{2+})_2$, (●); メトヘモグロビン

る。このように 3-HKN は赤血球内ヘモグロビンを酸化する作用があることが見い出されたが、

このことは3-HKNのサイドから見ればヘモグロビンと反応して何か他の物質に代謝されていることを示している。そこで私達はヒト赤血球における3-HKNの代謝産物の検討を行った。

b. ヒト赤血球における3-HKNの代謝について

まずヒト赤血球と3-HKNを6時間37°Cにおいてインキュベートした浮遊液を0.6規定過塩素酸で処理した。この試料を遠心操作で沈査を除き上清を得た。この上清の色は濃いオレンジ色であり明らかにうすい黄色を示す3-HKNとは異なる物質が生成されている。そこでこのオレンジ色の物質の時間的変化を分光学的にしらべた。すなわち3-HKNとヒト赤血球浮遊液を一定時間ごとに採取して凍結融解法で溶血し、セファデックスG-25に通して得たオレンジ色の分画を得た。この試料について400nmより500nmの間の吸収スペクトルを示したのが図2Aである。

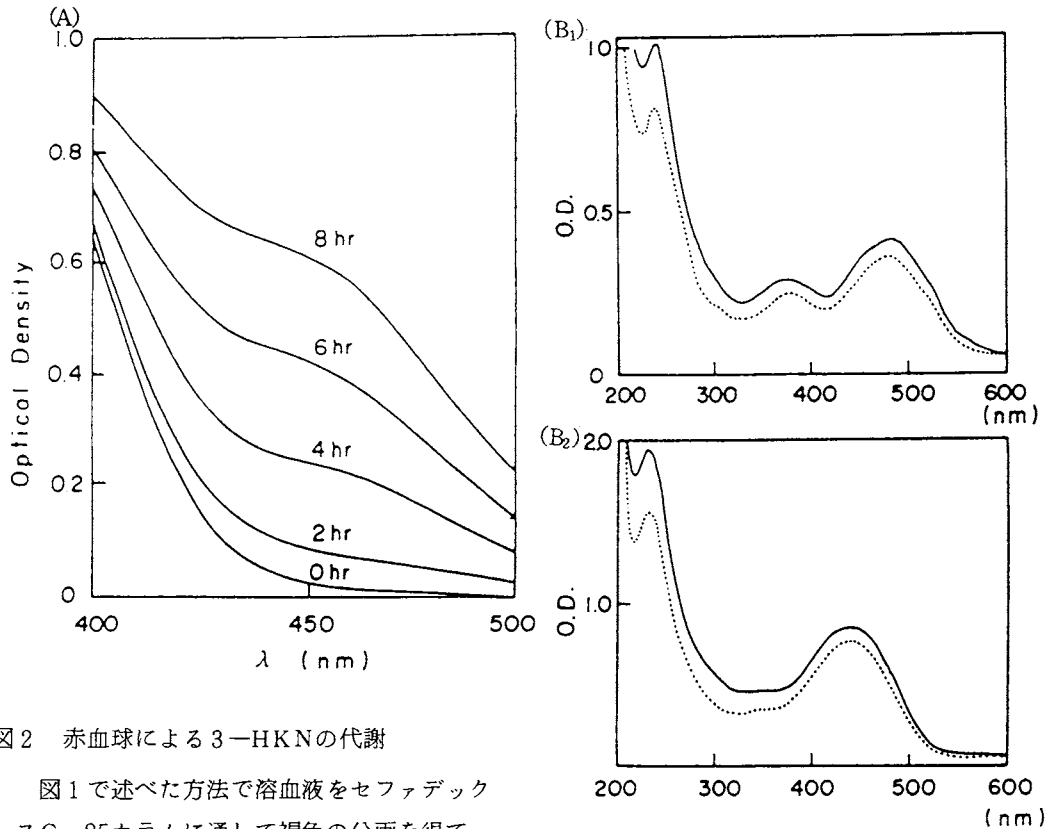


図2 赤血球による3-HKNの代謝

図1で述べた方法で溶血液をセファデックスG-25カラムに通して褐色の分画を得て、吸収スペクトルをしらべた。

A; 褐色分画の吸収スペクトルの時間的変化, B (B₁, B₂); 8時間目に採取した試料の吸収スペクトル。(B₁)は5規定塩酸溶液中のスペクトルを示し(B₂)は0.2モルリン酸溶液(pH 7.0)中のスペクトルを示す。(—); 試料, (---); 合成キサンタンマチン。

この結果は3-HKNの代謝物質が450nm付近に吸収最大をもっていることを示している。なお3-HKNは400nm付近に吸収最大をもっており450nm 付近の吸収度は非常に低い。

そこで3-HKNとフェリシアンカリを反応させて得たキサントマチンを対照として3-HKNとヒト赤血球を8時間インキュベートして得た試料の吸光度を比べたものが図2B(B₁, B₂)である。合成キサントマチンは5規定塩酸溶液中では240nm, 376nm, 480nmに吸収極大をもち(B₁), 0.2モルリン酸溶液中では234nmと440nmに吸収大をもっている(B₂)。ヒト赤血球と3-HKNの浮遊液より得た試料の吸収は塩酸溶液中及びリン酸溶液中においても合成キサントマチンと同様な吸収スペクトルを示した。この結果は3-HKNはヒト赤血球内でキサントマチンに代謝されていることを示している。

ヒト赤血球において3-HKNがキサントマチンに代謝されることをさらに明らかにするために高速液体クロマトグラフィと赤外吸収スペクトルの測定を行った。高速液体クロマトグラフィでしらべると3-HKNとヒト赤血球より得た試料は合成キサントマチンと同じ溶出時間でもって溶出された。

また図3は3-HKNとヒト赤血球を8時間インキュベートして得た試料の赤外吸収スペクトルを示す。このスペクトルは合成キサントマチンとよく一致したので、3-HKNはヒト赤血球内でキサントマチンへ代謝されていることを示している。

そこでヒト赤血球における3-HKNのキサントマチンへの代謝を種々の条件下でしらべた

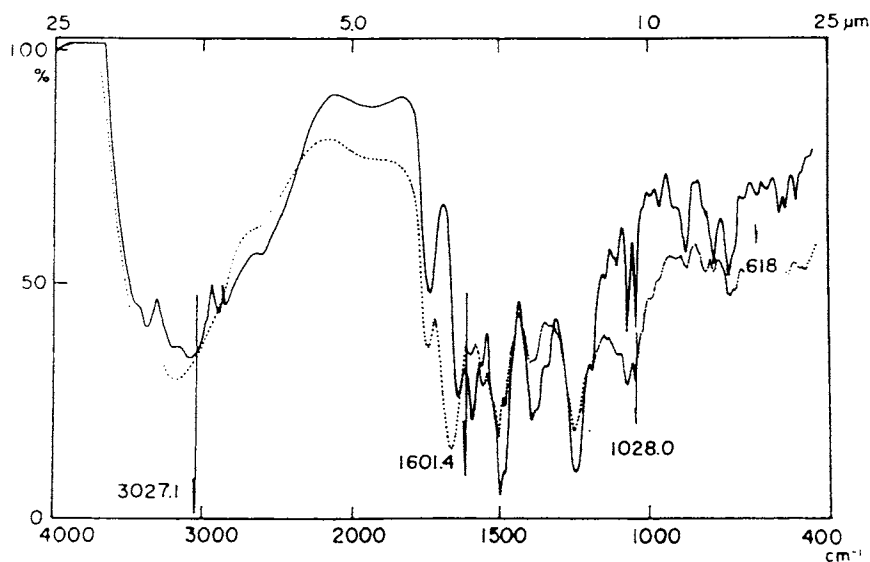


図3 合成キサントマチン及び試料の赤外スペクトル

実線は図2で述べたような試料を用いて測定した結果を示し、破線は合成キサントマチンの赤外スペクトルを示す。

(図4)。図から明らかなように赤血球内ヘモグロビンを一酸化炭素ヘモグロビンに変えた赤血球ではキサントマチンの合成は非常に抑えられた。赤血球内のヘモグロビンがオキシヘモグロビンの場合ではキサントマチンの合成速度は $250 \mu\text{mols}/\text{ml} \cdot \text{cell} \cdot \text{hr}$ であると推定された。また赤血球内のオキシヘモグロビンをメトヘモグロビンに変えて3-HKNの代謝をしらべたところ同様に反応が進行した。このようにオキシヘモグロビン及びメトヘモグロビンが3-HKNの代謝に関与していることを示唆するデータが得られた。このことについては第Ⅲ章で詳しく述べる。また3-HKNのキサントマチンへの代謝様式は図5のように示される。これは3-HKNがフェリシアンカリによってキサントマチンへ代謝される反応(Butenandt ら 1957)より推定したものである。

キサントマチンは昆虫の眼色素として重要な物質であるが、生体内でこの物質が存在するという報告はない。私達は現在のところ褐色白内障の患者レンズにキサントマチンが多く沈着していることを示唆する予備データを得ており、キサントマチンの生体内における生理的、病理的意義の検討が今後の課題である。

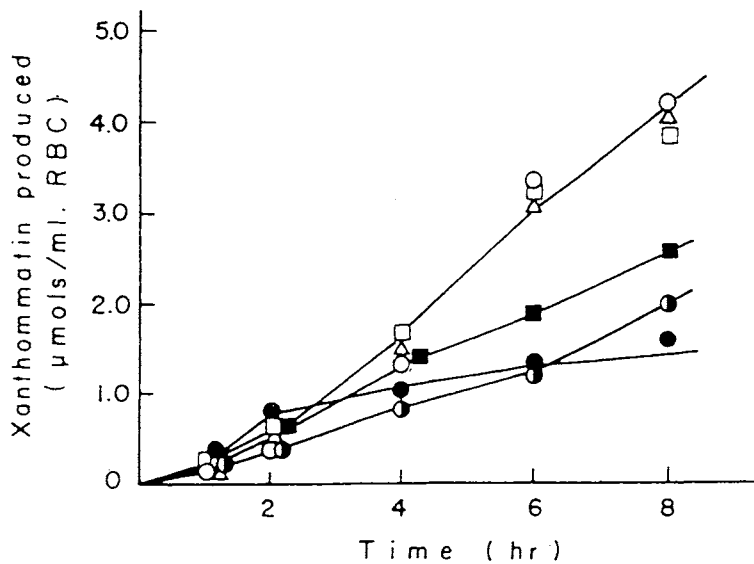
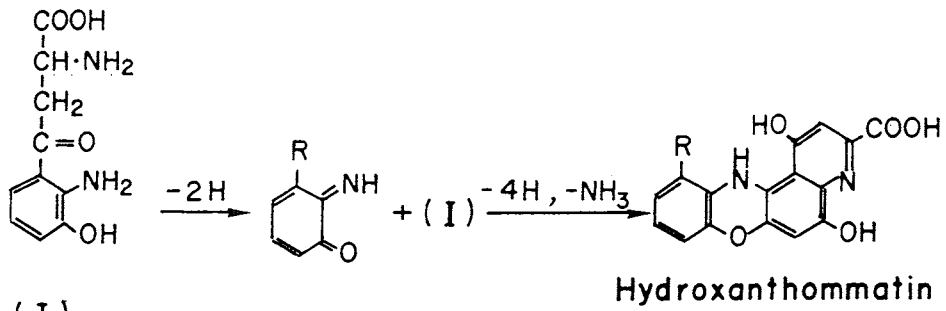


図4 ヒト赤血球における3-HKNのキサントマチンへの代謝

(○)対照, 赤血球内ヘモグロビンはオキシヘモグロビン, (△)シアン添加, 赤血球内ヘモグロビンはオキシヘモグロビン, (□)アザイド添加, 赤血球内ヘモグロビンはオキシヘモグロビン, (⊙)赤血球内ヘモグロビンは一酸化炭素ヘモグロビン, (●)赤血球内ヘモグロビンはメトヘモグロビン, (●)3-HKNの自然酸化



(I)

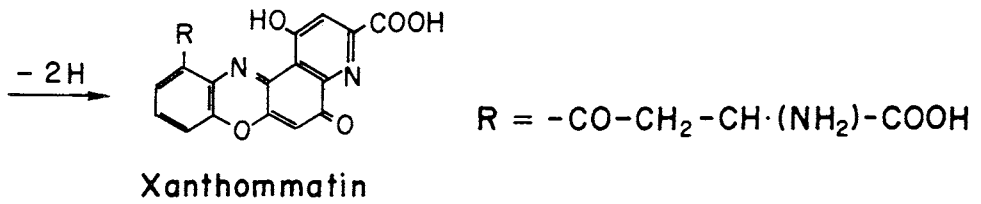


図5 ヒト赤血球における3-HKNの代謝の経路

Ⅱ. ヒト赤血球における3-HATの 代謝反応について

〔要 旨〕

ヒト赤血球浮遊液に3-HATを添加し37℃, pH 7.0でインキュベートしたところ, 赤血球内ヘモグロビンはメトヘモグロビンへ酸化された。また赤血球内のヘモグロビンの酸化反応と共役して3-HATはシンナバリン酸というオレンジ色の色素へ変化した。シンナバリン酸の同定は分光学的方法, 薄層クロマトグラフィ等で行った。またこのようなヒト赤血球における3-HATのシンナバリン酸への代謝反応を種々の条件下でしらべたところ, 酸素の存在が必要であり一酸化炭素の添加により反応は著しく阻害された。また赤血球内オキシヘモグロビンをメトヘモグロビンに変えて3-HATのシンナバリン酸への代謝をしらべたところ, 非常に速い速度で反応が進行した。

〔 序 〕

3-HATは3-HKN同様, NADの前駆体として生理的に重要なトリプトファン代謝中間体である。前章では3-HKNのヒト赤血球における代謝についての私達の研究結果を述べた。ここでは3-HKNの生理的代謝産物である3-HATのヒト赤血球における代謝反応について述べる。

〔実験方法〕

実験は3-HATを3-HKNの代りに用いた以外は第I章で述べた方法とほとんど同様に行った。

〔結果と考察〕

a. 3-HATによるヒト赤血球内ヘモグロビンの酸化

3-HATをヒト赤血球に添加すると赤血球の色調は2, 3時間以内に鮮紅色から茶褐色に変化する。このことは赤血球内のオキシヘモグロビンがメトヘモグロビンへ変化していていることを示している。このような3-HATによる赤血球内ヘモグロビンの酸化反応については報告がなかったので, 平板ゲル等電点電気泳動法を用いて詳しく調べた(図6 a, b)。図6 aは3-HATを含む赤血球浮遊液(pH 7.0, 37℃)を一定時間ごとに採取した試料について平板ゲル等電点電気泳動を行った結果である。この結果は赤血球内オキシヘモグロビンは時間とともに $(\alpha^{3+}\beta^{2+})_2$ や $(\alpha^{2+}\beta^{3+})_2$ のような半分酸化型ヘモグロビンに酸化され, さらにメトヘモグロビンに酸化されることを示している。この泳動結果を630nmでゲルスキャンニングして全ヘモグロ

ピン量に対する $(\alpha^{2+}\beta^{2+})_2$, $(\alpha^{3+}\beta^{2+})_2$, $(\alpha^{2+}\beta^{3+})_2$, および $(\alpha^{3+}\beta^{3+})_2$ の量比 (%) を時間についてプロットしたものが図 6 b である。オキシヘモグロビン [$(\alpha^{2+}\beta^{2+})_2$] は時間とともに $(\alpha^{3+}\beta^{2+})_2$, $(\alpha^{2+}\beta^{2+})_2$ さらには $(\alpha^{3+}\beta^{3+})_2$ へ変化していった。ただしメトヘモグロビンの生成は 1 時間でプラトーに達した。このことは 3-HAT により生成されたメトヘモグロビンが逆に還元型ヘモグロビンへ還元されて両反応が平衡状態になっていることを示す。

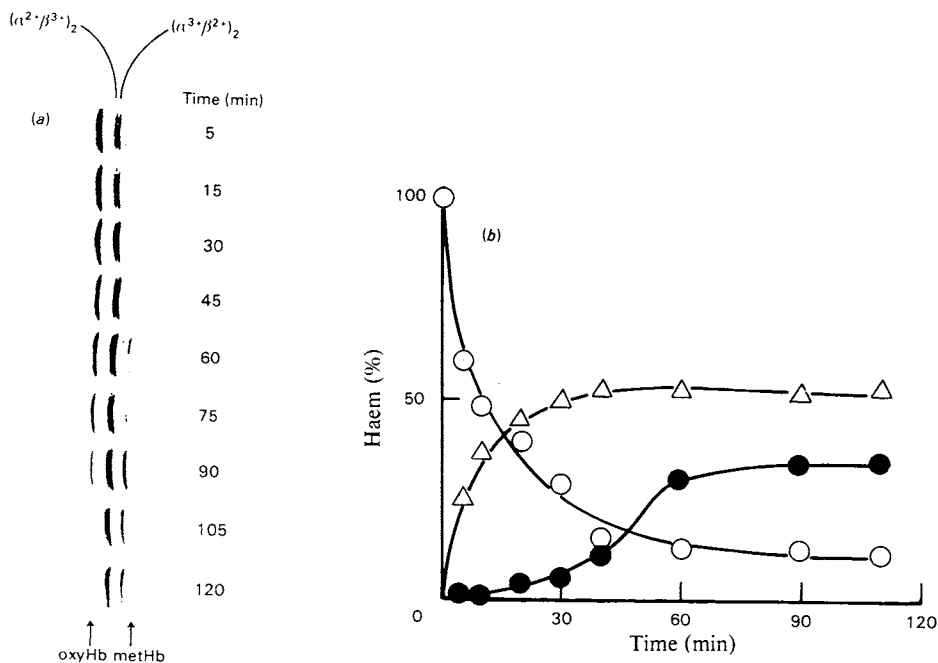


図 6 3-HAT によるヒト赤血球内ヘモグロビンの酸化反応とその時間的経過

- a 平板ゲル等電点電気泳動による赤血球内ヘモグロビンの分析, 3-HAT をヒト赤血球に添加したのち, 一定時間ごとに試料を採取した。この試料を溶血して, セファデックス G-25 カラムに通した。ヘモグロビンを含む分画について等電点電気泳動を行った。
- b a 図の結果を 630 nm でゲルスキャンニングして全ヘモグロビン量に対するオキシヘモグロビン (○), $(\alpha^{2+}\beta^{3+})_2 + (\alpha^{3+}\beta^{2+})_2$ (△), メトヘモグロビン (●) の比を求めた。

b. ヒト赤血球における 3-HAT の代謝について

図 7 はヒト赤血球より精製したオキシヘモグロビンとメトヘモグロビンを 3-HAT と 90 分反応させたのち, ヘモグロビンを除いて得られる試料の吸収スペクトルを示したものである。この試料はオレンジ色の色調をもっているが吸収スペクトルは 450 nm にピークをもつ独特なものであった。な

お3-HATは450 nm付近にはほとんど吸収をもたない。このような吸収スペクトルは3-HATとフェリシアンカリによって人工的に合成したシンナバリン酸の吸収スペクトルとよく一致した。よって3-HATはオキシヘモグロビンあるいはメトヘモグロビンと反応してシンナバリン酸へ代謝されると考えられる。生体内では通常3-HATは2-アクロレイル3-アミノフマル酸へ代謝されることが知られており、このような3-HATのシンナバリン酸への代謝反応については詳しく知られていない。

そこでヒト赤血球における3-HATの代謝反応を検討した。図8はヒト赤血球に3-HATを加えたのち37℃で2時間インキュベートして得られる試料について分光学的にしらべた結果である。その結果、時間とともに赤血球中に455 nmに吸収極大をもつ物質が蓄積し、3-HATがシンナバリン酸へ代謝されていることを示している(図8 a)。そこで455 nmの吸収の増加を時間についてプロットすると図8 bの結果が得られた。この図よりヒト赤血球におけるシンナバリン酸の合成速度はpH 7.0, 37℃において約200 $\mu\text{mols}/\text{ml} \cdot \text{赤血球} \cdot \text{時間}$ と推定された。この数値はヒト赤血球におけるグルコースの代謝速度と同じオーダーであり、比較的速いといえる。

ヒト赤血球において3-HATよりシンナバリン酸が合成されることをさらに確かめるために薄層クロマトグラフィで検討した。図9に示すように、赤血球と3-HATを2時間インキュベートして得た試料には3-HAT以外にシンナバリン酸のスポットが存在した。このことは赤血球内で3-HATが代謝されてシンナバリン酸が合成されていることを示している。

次にヒト赤血球におけるシンナバリン酸の合成速度を種々の条件下で検討した(図10)。赤血球内のヘモグロビンが二価鉄の場合では、シアンやアザイド添加によっては3-HATの合成速

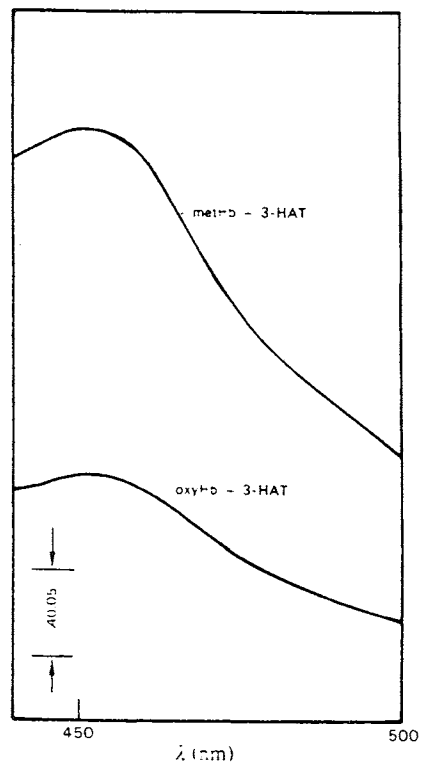


図7 精製したオキシヘモグロビン、メトヘモグロビンによる3-HATの代謝

精製したオキシヘモグロビンあるいはメトヘモグロビンと3-HATを90分間反応させたのち、セファデックスG-25カラムに通した。オレンジ色の分画について吸収スペクトルをしらべた。

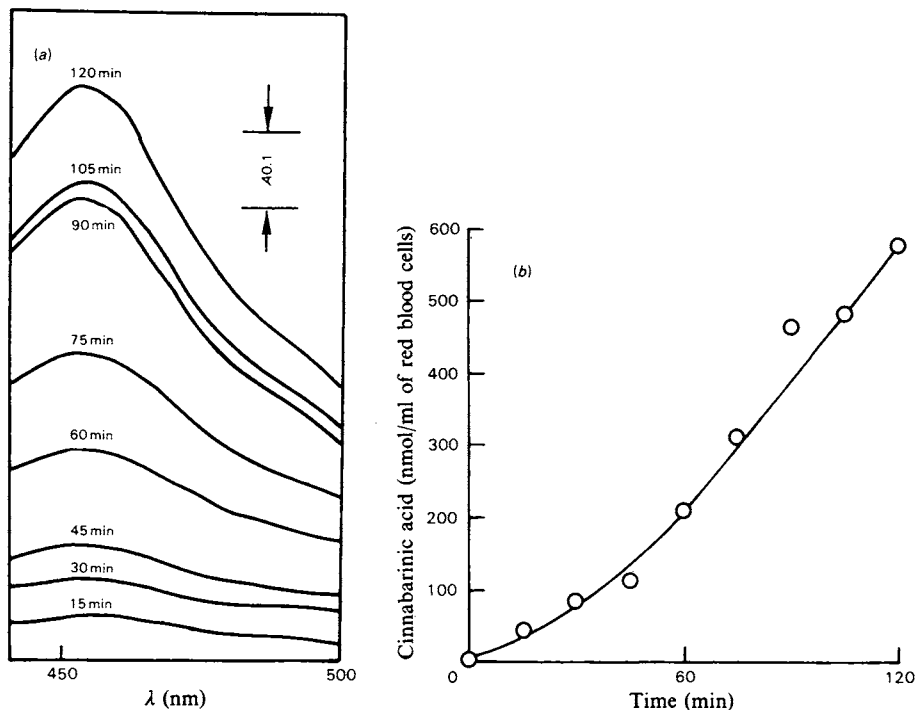


図8 ヒト赤血球における3-HATの代謝の分光学的分析

- a. ヒト赤血球による3-HATの代謝。ヒト赤血球に3-HATを加え2時間37°C, pH7.0にてインキュベートした。一定時間ごとに試料を採取して溶血し、溶血液をセファデックスG-25カラムに通した。このようにして得られるオレンジ色の分画について吸収スペクトルをしらべた。
- b. ヒト赤血球におけるシンナバリン酸の合成。図aにおける455nmの吸光度の変化を時間についてプロットした。

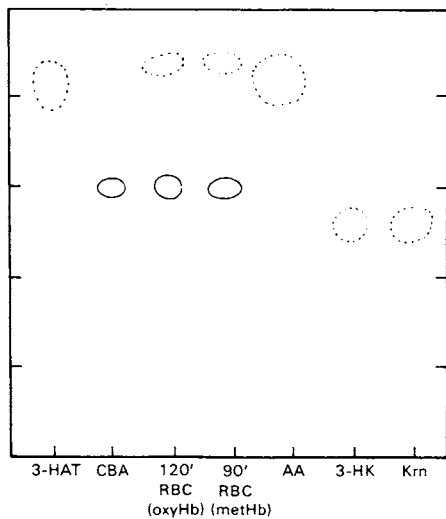
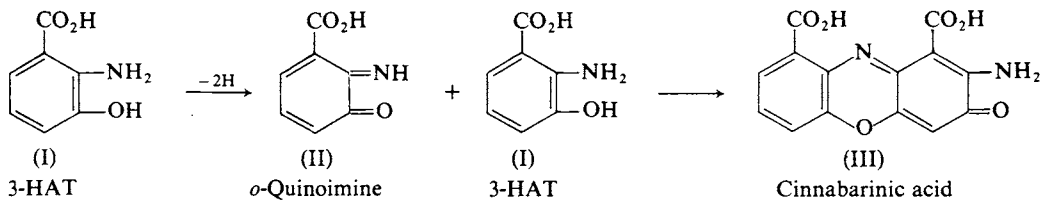


図9 薄層クロマトグラフィによるシンナバリン酸の同定

CBA, 合成シンナバリン酸; RBC, ヒト赤血球; 3-HK, 3-ヒドロキシキヌレニン; AA, アントラニル酸; Krr, キヌレニン

度は影響されなかった。しかしながらオキシヘモグロビンを一酸化炭素ヘモグロビンに変えるとシンナバリン酸の合成速度は非常に抑えられた。このことは3-HATの代謝にオキシヘモグロビンの存在が必須であることを示している。一方、赤血球内ヘモグロビンをメトヘモグロビンに変えると3-HATの代謝は約3倍に促進された。しかしながらメトヘモグロビンと複合体をつくるシアンを添加すると3-HATの代謝は非常に抑えられた。このことは3-HATの代謝にメトヘモグロビンそのものが必要であることを示している。すなわち、メトヘモグロビンが3-HATにより還元されるような状態が3-HATの代謝に要求されると考えられる。

以上の結果よりヒト赤血球においては3-HATが他の有核細胞で2-アクロレイル-3-アミノフマル酸に代謝されるのとは異って、シンナバリン酸へ代謝されることが明らかになった。3-HATのシンナバリン酸への代謝経路は次のように考えられる。



シ ョ ー マ 1

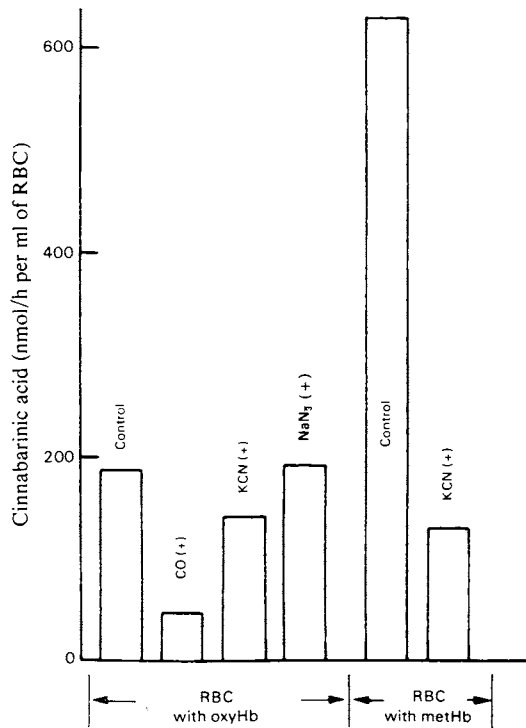


図 10 種々の条件下におけるヒト赤血球のシンナバリン酸合成速度

Ⅲ 3-HKNと3-HATによるヘモグロビンの酸化還元反応について

〔要 旨〕

3-HKNや3-HATのヘモグロビン酸化およびメトヘモグロビンの還元作用について明らかにした。これらのトリプトファン代謝中間体はオキシヘモグロビンを酸化してメトヘモグロビンへ、メトヘモグロビンを還元してオキシヘモグロビンへ変化させた。これらの反応と共役し3-HKNはキサントマチンへ、3-HATはシンナバリン酸へ代謝された。また3-HKN、3-HATによるヘモグロビンの酸化還元反応は活性酸素のスカベンジャーであるカタラーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)の影響をうけることから反応のメカニズムを推定した。またヘモグロビンのアロステリックエフェクターであるイノシトールヘキサリン酸によってこれらの反応は促進された。

〔序〕

第Ⅰ章、第Ⅱ章で述べたように赤血球内ヘモグロビンは3-HKNや3-HATにより酸化されることが明らかになった。また赤血球内メトヘモグロビンは還元されることを示唆する結果を得た。この章では3-HKNや3-HATによるオキシヘモグロビンの酸化、メトヘモグロビンの還元反応について詳しく検討したのでその結果を述べる。

〔実験方法〕

ヘモグロビンはヒト赤血球を溶血してゴーストを除いたのち、セファデックスG-25カラムで精製した。この精製ヘモグロビンをフェリシアンカリで酸化してメトヘモグロビンを得た。実験はオキシヘモグロビンあるいはメトヘモグロビンを含む石英セル内で行い、3-HATあるいは3-HKNを添加したのちの吸収スペクトルの変化をしらべた。また反応液に予めカタラーゼ、SOD、イノシトールヘキサリン酸(P₆-イノシトール)などを添加しておき、3-HAT、3-HKNによるヘモグロビンの酸化還元反応を検討した。なお嫌氣的条件下で実験を行う場合はツンベルク管内に試料を予め入れて、脱気したのち3-HKN、3-HATを加えて反応を開始した。

〔結果と考察〕

a. 3-HKN、3-HATによるヘモグロビンの酸化反応

図11はオキシヘモグロビン溶液に3-HATを加えたのちにみられる吸収スペクトルの時間的変化である。オキシヘモグロビンの特徴である545nmと578nmの吸収極大は時間とともに低下し、

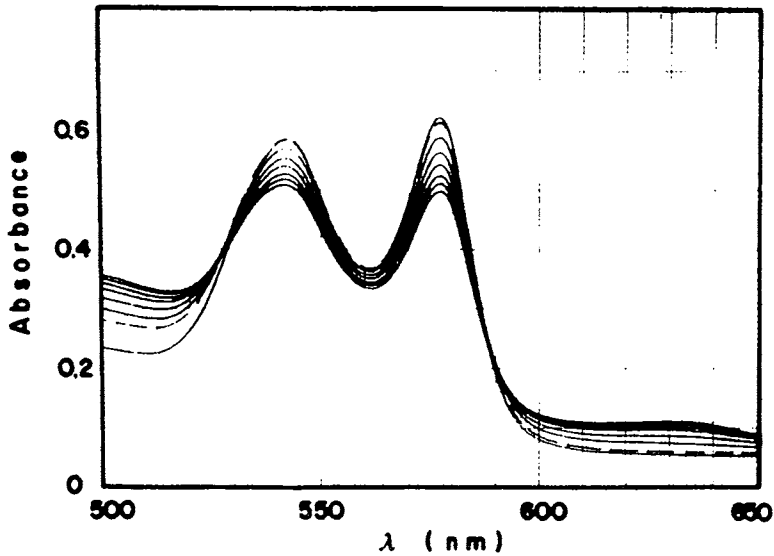


図11 3-HATによるオキシヘモグロビンの酸化

オキシヘモグロビン(100 μM ヘム)に対して500 μM 3-HATを加えてオキシヘモグロビンの酸化プロセスを分光学的に追跡した。

メトヘモグロビンに特有な630nmの吸収が増加してきた。このことはオキシヘモグロビンが3-HATによりメトヘモグロビンへと酸化されていることを示している。3-HATの代りに3-HKNを用いても同様な結果が得られた。表1には種々の条件下で3-HATおよび3-HKNによるヘモグロビンの酸化反応をしらべた結果を示す。嫌氣的条件下では反応が全く進行しないので、3-HATや3-HKNによるヘモグロビンの酸化反応には酸素が必要であると考えられる。また P_6 -イノシトールにより反応は数倍に促進されたが、これはヘモグロビンの高次構造がR型からT型へ変化したためと考えられる。

図12には3-HATによるオキシヘモグロビンの酸化反応を活性酸素のスカベンジャーであるカタラーゼ、SOD存在下でしらべた結果を示す。カタラーゼ、SOD非添加の対照に比べ、カタラーゼ存在下ではオキシヘモグロビンの酸化反応は阻害され、またSOD存在下では促進された。このことは3-HATによるオキシヘモグロビンの酸化反応にさいして活性酸素の一種である過酸化酸素(H_2O_2)やスーパーオキシド(O_2^-)が反応に関与していることを示しており、後に詳しく述べる。

Rates of Oxydation of Oxy- and Deoxyhemoglobin with 3-HAT and 3-HKN
Under Various Conditions

		Autoxidation rates of hemoglobin ($\mu\text{M}/\text{min}$)	Oxidation rates of hemoglobin ($\mu\text{M}/\text{min}$)	
			(-) 3-HAT	(+) 3-HKN
(+) Oxygen	(-) P_6 -inositol	0.044	0.52	0.52
	(+) P_6 -inositol	0.175	3.9	8.4
(-) Oxygen	(-) P_6 -inositol	0	0	0
	(+) P_6 -inositol	0	0	0

表1 3-HAT (3-HKN) によるオキシヘモグロビンおよびデオキシヘモグロビンの酸化反応

精製したヘモグロビンについて好氣的あるいは嫌氣的条件下で3-HAT (あるいは3-HKN) による酸化反応を578nmの吸収の変化をしらべた。

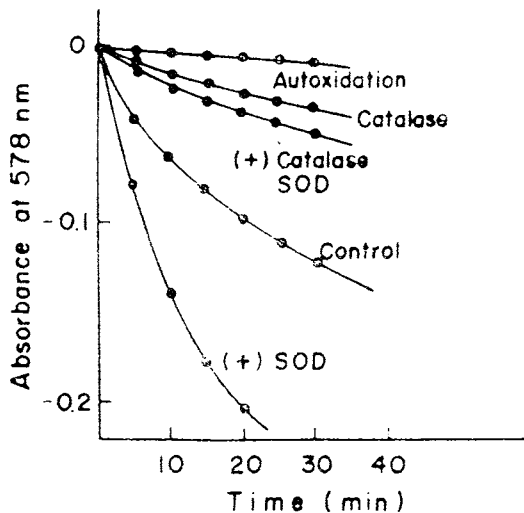


図12 3-HATによるオキシヘモグロビンの酸化反応におよぼすカタラーゼ, SODの影響

3-HATによるオキシヘモグロビンの酸化反応をカタラーゼ, SOD存在下, 非存在下で578nmの吸収の変化でしらべた。

b. 3-HKN, 3-HATによるメトヘモグロビンの還元方法

3-HKN, 3-HATはオキシヘモグロビンをメトヘモグロビンへ酸化することを私達は見出した。ところがこれらの物質はメトヘモグロビン溶液に加えられるとメトヘモグロビンを還元してオキシヘモグロビンへもどす作用があることも明らかになった。表2に示すように, 好氣的条件下(酸素存在下)及び嫌氣的条件下(酸素非存在下)において3-HAT, 3-HKNによるメトヘモグロビンの還元反応は進行した。特にメトヘモグロビンに対するアロステリックエフェクターである P_6 イノシトールを加えることにより反応は著しく促進された。

Rates of Reduction of Methemoglobin Under Aerobic and Anaerobic Conditions

		Reduction rates of methemoglobin ($\mu\text{M}/\text{min}$)	
		(+) 3-HAT	(+) 3-HKN
(+) Oxygen	(-) P_6 -inositol	1.75	0.31
	(+) P_6 -inositol	10.5	1.58
(-) Oxygen	(-) P_6 -inositol	0.57	0.12
	(+) P_6 -inositol	2.2	0.59

表2 3-HAT(3-HKN)によるメトヘモグロビンの還元反応

精製したメトヘモグロビンの3-HAT(あるいは3-HKN)による還元反応を好氣的、嫌氣的条件下でしらべた(578nmの吸光度の変化)。

そこでカタラーゼ, SOD存在下で3-HATによるメトヘモグロビンの還元反応をしらべた(図13)。3-HATによるメトヘモグロビンの還元反応はSODによって抑制されたが, カタラーゼによっては全く影響をうけなかった。

以上のような3-HAT, 3-HKNによる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の実験結果から

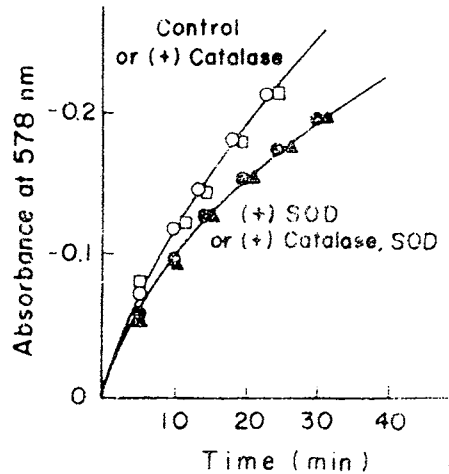
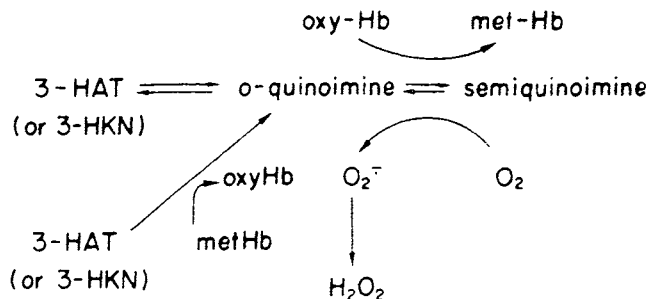


図13 3-HAT(3-HKN)によるメトヘモグロビンの還元反応におよぼすカタラーゼ, SODの影響



シエーマ 2

シェーマ2のような反応プロセスが考えられる。すなわち、3-HAT（あるいは3-HKN）によるオキシヘモグロビンの酸化反応では3-HATと平衡状態にある3-HATのオルトキノイミンが反応に関与すると考えられる。オキシヘモグロビンはオルトキノイミンと反応してメトヘモグロビンに酸化されるが、このときにオルトキノイミンはセミキノイミンに変化すると考えられる。セミキノイミンは酸素との反応性が強いのでスーパーオキシド($O_2^{\cdot-}$)がすぐ生成され、また過酸化水素(H_2O_2)もつづいて生成される。 H_2O_2 はヘモグロビンの酸化作用が強い。よって H_2O_2 のスカベンジャーであるカタラーゼ存在下では3-HATによるオキシヘモグロビンは抑制されると考えられる。また $O_2^{\cdot-}$ のスカベンジャーであるSOD存在下では $O_2^{\cdot-}$ より H_2O_2 への反応が促進されるので結果的にオキシヘモグロビンの酸化反応は促進されると考えられる。

またメトヘモグロビンの還元反応は3-HATがメトヘモグロビンに直接作用することによって起こると考えられる。スーパーオキシド($O_2^{\cdot-}$)はメトヘモグロビンの還元作用があるので、反応途中で生成されたスーパーオキシドをSODで除くと、3-HATによるメトヘモグロビンの還元反応は抑制されることになる。

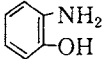
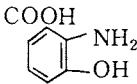
一方、3-HAT(3-HKN)とヘモグロビンとの反応によってシンナバリン酸やキサントマチンが生成されるが、これはシェーマ1と図5に示すようにオルトキノイミンと3-HAT(3-HKN)が縮合されることによると考えられる。

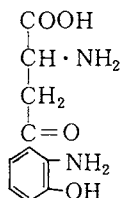
Ⅳ ヒト赤血球によるオルトアミノフェノールの代謝について

〔要 旨〕

精製したオキシヘモグロビンあるいはメトヘモグロビンとオルトアミノフェノールを反応させるとオルトアミノフェノールによってオキシヘモグロビンはメトヘモグロビンへ酸化され、またメトヘモグロビンはオキシヘモグロビンへ還元された。この反応と共役してオルトアミノフェノールは2-アミノフェノキサゾン3-オンという褐色色素に代謝された。この反応はヒト赤血球を用いた場合でもおこり、赤血球内のヘモグロビンがオルトアミノフェノールと反応していることを示す。

〔序〕

オルトアミノフェノールの構造は  であり、  (=3-HAT) や



(=3-HKN) と非常に似ている。オルトアミノフェノールは古くから生体にとり込まれるとメトヘモグロビン血症をひきおこすことが知られており、赤血球にオルトアミノフェノールが入ってオキシヘモグロビンを酸化すると考えられる。このことはオキシヘモグロビンの酸化と共役してオルトアミノフェノールは第Ⅰ～第Ⅲ章で述べたように二分子縮合されることを示唆する。この章ではヒト赤血球におけるオルトアミノフェノールの2-アミノフェノキサジン3-オンへの代謝反応をヘモグロビンの酸化還元反応と比べながら検討した。

〔実験方法〕

オキシヘモグロビン及びメトヘモグロビンは第Ⅲ章に述べた方法で精製した。またヒト赤血球は第Ⅰ章と同様な方法で得た。実験はオルトアミノフェノールを3-HAT、3-HKNの代りに用いた以外は第Ⅰ、Ⅱ章と同様に行った。

〔結果と考察〕

図14は精製オキシヘモグロビンとオルトアミノフェノールを反応させて得た試料をセファデックSG-25カラムに通して得た褐色画分を分光学的に追跡した結果である。時間とともにオルトアミノフェノールは435nmに吸収極大をもつ特有のスペクトルを示す物質に変っていった。反応後60分のサンプルの吸光スペクトルを種々の溶液中でしらべると図14のコラムのようになった。オルトア

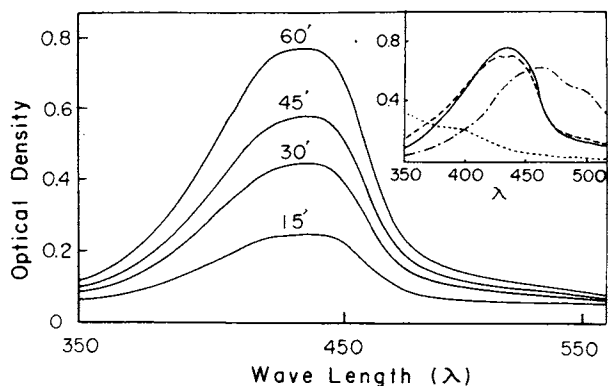


図14 精製したオキシヘモグロビンと
 オルトアミノフェノールの反応の
 分光学的追跡

図中のコラムには60分の試料をリ
 ン酸溶液中(—), クロロフォルム,
 メタノール溶液中(---), 塩酸溶液
 中(---), カセイソーダ溶液中
 (---) において吸収スペクトルを
 しらべた結果を示す。

ミノフェノールとフェリシアンカリを反応させると2-アミノフェノキサジン3-オンが得られることが知られているので、この反応により2-アミノフェノキサジン3-オンを人工的に合成した。この試料について種々の溶液中で吸収スペクトルをしらべると図14のコラムのスペクトルとよく一致した。このことはオルトアミノフェノールとオキシヘモグロビンとの反応により2-アミノフェノキサジン3-オンが生成されることを示している。なおオキシヘモグロビンはオルトアミノフェノールにより迅速に酸化されてメトヘモグロビンへ変化した。また精製したメトヘモグロビンとオルトアミノフェノールとを反応させても2-アミノフェノキサジン3-オンが同様に生成された。この場合は、メトヘモグロビンはオルトアミノフェノールによりオキシヘモグロビンへ還元された。

オルトアミノフェノールとヘモグロビンとの反応により2-アミノフェノキサジン3-オンが生成されることをさらに明らかにするために、オキシヘモグロビンとオルトアミノフェノールの反応生成物を高速液体クロマトグラフィによって分析した(図15)。その結果、オルトアミノフェノールとオキシヘモグロビンと反応させて生成される化合物の溶出時間は合成2-アミノフェノキサジン3-オンの溶出時間とよく一致した。

そこでヒト赤血球におけるオルトアミノフェノールの代謝を種々の条件下で検討した(図16)。赤血球内のヘモグロビンが二価鉄である場合はオルトアミノフェノールは非常に速い速度で2-アミノフェノキサジン3-オンに代謝された(○)。しかしながらオキシヘモグロビンを一酸化炭素ヘモグロビン(●)に変えると反応は非常に抑えられた。このことはヘモグロビンが二価鉄である場合はオキシヘモグロビンが反応に必須であることを示している。またカタラーゼの阻害剤であるシアンを加えても反応は影響されなかった(△)。

一方、赤血球内のヘモグロビンをメトヘモグロビンに変えると反応は同様に進行した(●)。この場合、メトヘモグロビンと複合体をつくるシアンやアザイドを予め加えておくと反応は完全に抑えられた(△, ■)。このことはオルトアミノフェノールの代謝にはメトヘモグロビンは関与するが、メトヘモグロビン・シアン複合体は関与しないことを示している。

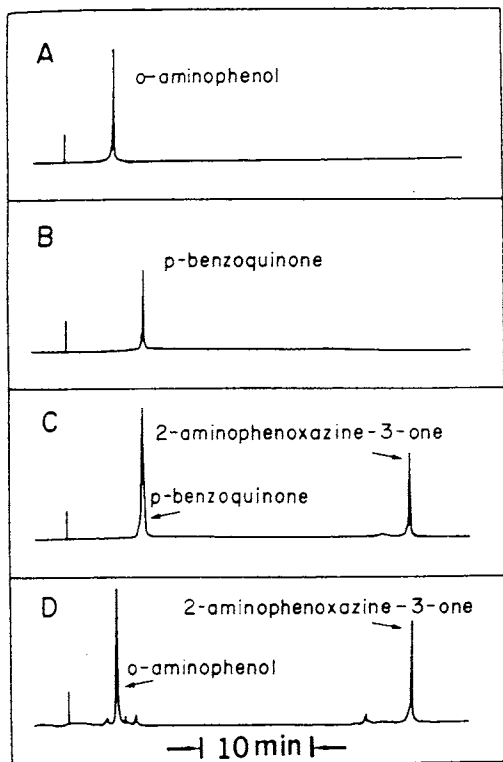


図 15 HPLCによる2-アミノフェノキサジン3-オンの同定

オキシヘモグロビンとオルトアミノフェノールを30分反応させたのちに得られた試料についてHPLCで分析した。なお合成2-アミノフェノキサジン3-オンはオルトアミノフェノールとパラベンゾキノンとの反応によって得た。

以上の結果からヒト赤血球におけるオルトアミノフェノールの反応は次のように示される。

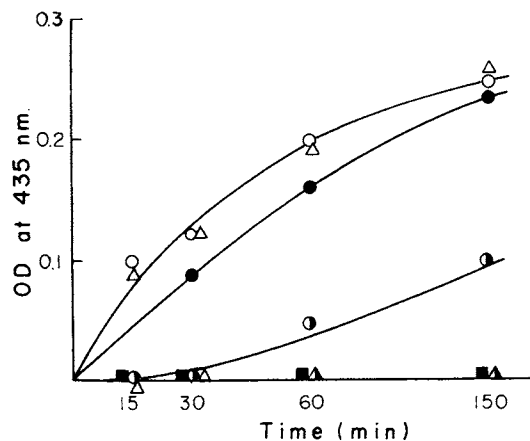
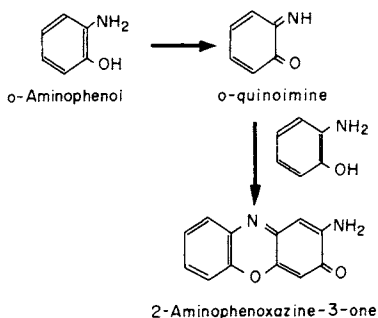


図 16 ヒト赤血球によるオルトアミノフェノールの代謝

ヒト赤血球にオルトアミノフェノールを加えたのち一定時間ごとに試料を採取した。この試料を溶血処理したのちセファデックスG-25カラムに通した。このようにして得られた褐色分画について2-アミノフェノキサジン3-オンの変化をしらべた。(○)赤血球内ヘモグロビンはオキシヘモグロビン、(●)赤血球内ヘモグロビンは一酸化炭素ヘモグロビン、(Δ)シアン添加、赤血球内ヘモグロビンはオキシヘモグロビン、(●)赤血球内ヘモグロビンはメトヘモグロビン、(▲)シアン添加、赤血球内ヘモグロビンはメトヘモグロビン、(■)アザイド添加、赤血球内ヘモグロビンはメトヘモグロビン。

シエーマ 3

このプロセスは第Ⅰ～Ⅲ章で述べたように、オルトアミノフェノールがキノイミン化合物と反応しておこる縮合反応である。この結果はオルトアミノフェノールによっておこるメトヘモグロビン血症の患者血液中には2-アミノフェノキサジン3-オンが大量に蓄積することを示唆している。

ま と め

第Ⅰ章より第Ⅳ章まで、ヒト赤血球における3-HKN, 3-HAT, オルトアミノフェノールの代謝についての解析を私達の研究結果をもとに検討した。とくに3-HKN, 3-HATはトリプトファンの代謝中間体であり生理的物質であるので、赤血球でこれらの物質がフェノキサゾン系色素に代謝されることは興味ある事実である。今後、血液中に3-HATや3-HKNが蓄積した患者（例えば重症糖尿病）におけるキサントマチン、シンナバリン酸の増加について検討を加える必要があり現在進行中である。

またオルトアミノフェノールは通常生体内には存在しないと考えられるが、中毒性メトヘモグロビン血症の原因にもなり、生体内にこの物質が吸収された場合は2-アミノフェノキサジン3-オンの生成が問題になるであろう。